(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第5187642号
(P5187642)

(45)発行日　平成25年4月24日(2013.4.24)　(24)登録日　平成25年2月1日(2013.2.1)

(51)Int.Cl.		F I		
A61K 39/02	(2006.01)	A61K	39/02	ZNA
A61K 39/112	(2006.01)	A61K	39/112	
A61K 39/106	(2006.01)	A61K	39/106	
A61K 35/74	(2006.01)	A61K	35/74	A
A61K 9/48	(2006.01)	A61K	9/48	

請求項の数 18　(全 26 頁)　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2009-505269 (P2009-505269)
(86)(22)出願日　平成20年3月19日 (2008.3.19)
(86)国際出願番号　PCT/JP2008/055815
(87)国際公開番号　WO2008/114889
(87)国際公開日　平成20年9月25日 (2008.9.25)
審査請求日　平成22年10月25日 (2010.10.25)
(31)優先権主張番号　特願2007-70626 (P2007-70626)
(32)優先日　平成19年3月19日 (2007.3.19)
(33)優先権主張国　日本国(JP)

(73)特許権者　000191755
森下仁丹株式会社
大阪府大阪市中央区玉造一丁目２番４０号
(73)特許権者　504150450
国立大学法人神戸大学
兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１
(74)代理人　100163647
弁理士　進藤　卓也
(72)発明者　白川　利朗
日本国兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１
国立大学法人神戸大学内
(72)発明者　川端　眞人
日本国兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１
国立大学法人神戸大学内

最終頁に続く

(54)【発明の名称】経口ワクチン

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
細菌感染性疾患に対する経口ワクチンであって、該経口ワクチンがカプセル製剤の形態であり、該カプセル製剤が、カプセル皮膜と抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物とで構成され、該カプセル皮膜が耐酸性であり、該形質転換微生物が該カプセル皮膜によって包含されている、経口ワクチン。
【請求項２】
前記抗原タンパク質フラジェリンが前記微生物の菌体内に発現される、請求項１に記載の経口ワクチン。
【請求項３】
前記抗原タンパク質フラジェリンが前記微生物の菌体外に分泌される、請求項１に記載の経口ワクチン。
【請求項４】
前記微生物が、ビフィドバクテリウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）属、ラクトコッカス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、ペディオコッカス（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）属、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、エンテロコッカス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）属、ロイコノストック（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ）属、テトラゲノコッカス（Ｔｅｔｒａｇｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、エノコッカス（Ｏｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、およびワイセラ（Ｗｅｉｓｓｅｌｌａ）属からなる群に属する微生物から選択される少なくとも１種である、請求項１か

ら３のいずれかに記載の経口ワクチン。
【請求項５】
前記経口ワクチンが、腸チフス、コレラ、または赤痢に対するワクチンである、請求項１から４のいずれかに記載の経口ワクチン。
【請求項６】
前記カプセル製剤が、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、または硬カプセル製剤である、請求項１から５のいずれかに記載の経口ワクチン。
【請求項７】
細菌感染性疾患に対する経口ワクチンの製造方法であって、
抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物を調製する工程；
および
該形質転換微生物を耐酸性のカプセル皮膜によって封入して、耐酸性カプセル製剤を生成する工程；
を含む、方法。
【請求項８】
前記形質転換微生物が、抗原タンパク質フラジェリンを菌体内に発現する、請求項７に記載の方法。
【請求項９】
前記形質転換微生物が、抗原タンパク質フラジェリンを菌体外に分泌する、請求項７に記載の方法。
【請求項１０】
前記微生物が、ビフィドバクテリウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）属、ラクトコッカス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、ペディオコッカス（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）属、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、エンテロコッカス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）属、ロイコノストック（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ）属、テトラゲノコッカス（Ｔｅｔｒａｇｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、エノコッカス（Ｏｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、およびワイセラ（Ｗｅｉｓｓｅｌｌａ）属からなる群に属する微生物から選択される少なくとも１種である、請求項７から９のいずれかに記載の方法。
【請求項１１】
前記経口ワクチンが、腸チフス、コレラ、または赤痢に対するワクチンである、請求項７から１０のいずれかに記載の方法。
【請求項１２】
前記カプセル製剤が、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、または硬カプセル製剤である、請求項７から１１のいずれかに記載の方法。
【請求項１３】
細菌感染性疾患に対する経口ワクチンの製造方法であって、
抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物を調製する工程；
該形質転換微生物をカプセル皮膜によって封入して、カプセル製剤を生成する工程；および
該生成したカプセル製剤のカプセル皮膜を耐酸性にする工程；
を含む、方法。
【請求項１４】
前記形質転換微生物が、抗原タンパク質フラジェリンを菌体内に発現する、請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記形質転換微生物が、抗原タンパク質フラジェリンを菌体外に分泌する、請求項１３に記載の方法。
【請求項１６】
前記微生物が、ビフィドバクテリウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ラクトバ

チルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）属、ラクトコッカス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、ペディオコッカス（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）属、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、エンテロコッカス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）属、ロイコノストック（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ）属、テトラゲノコッカス（Ｔｅｔｒａｇｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、エノコッカス（Ｏｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、およびワイセラ（Ｗｅｉｓｓｅｌｌａ）属からなる群に属する微生物から選択される少なくとも１種である、請求項１３から１５のいずれかに記載の方法。

【請求項１７】

前記経口ワクチンが、腸チフス、コレラ、または赤痢に対するワクチンである、請求項１３から１６のいずれかに記載の方法。

【請求項１８】

前記カプセル製剤が、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、または硬カプセル製剤である、請求項１３から１７のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、細菌の感染症の予防および治療に有用な経口ワクチンおよびその製造方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

腸チフスは、サルモネラの一種であるチフス菌（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｅｎｔｅｒｉｃａ　ｖａｒ．Ｔｙｐｈｉ）によって引き起こされる感染症の一種であり、汚染された飲み水や食物などを摂取することにより、感染に至る。腸チフスは、全世界、特にアジア、中東、東欧、アフリカおよび中南米地域に多発している。年間１，６００万人が腸チフスに罹患し、６０万人が命を落としており、犠牲者は主に発展途上国の乳幼児である。現在、サルモネラ菌を起炎菌とする腸チフスに対するワクチンとして、弱毒化サルモネラ菌（Ｔｙ２１ａ）などの経口投与が行われているが、下痢や嘔吐などの副作用を伴うため５歳以下の乳幼児には投与できない。腸チフスは、一旦感染に至ると、体内で抗体が作成されるため、免疫が獲得されるが、この効果は長く持続しない。

コレラは、ビブリオ属（Ｖｉｂｒｉｏ　ｃｈｏｌｅｒａｅ　０１又は０１３９）によって引き起こされる感染症の一種である。コレラは、全世界、特にアジア、中東、およびアフリカに多発している。クラシカルコレラは、大流行を幾度となく繰返し、その病原性の強さ（死亡率２０％）によって何百万もの人が犠牲となっている。現在、予防接種も行われているが、効果は比較的低く、５０％程度であるとされている。

細菌性赤痢は、世界中に広く分布する細菌性の感染症であり、特に衛生状態の悪い国で多く見られる。細菌性赤痢は、シゲラ（Ｓｈｉｇｅｌｌａ）属に属する腸内細菌により引き起こされ、病原性が強い順に、Ｓｈｉｇｅｌｌａ　ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ、Ｓ．ｆｌｅｘｎｅｒｉ、Ｓ．ｂｏｙｄｉｉ、およびＳ．ｓｏｎｎｅｉの４群がある。

上記のように、細菌による種々の感染症があり、効果的な細菌性感染症に対するワクチンが必要とされていることは明らかである。特に、ヒトからヒトに伝染する感染症を防御するためのワクチンが必要とされている。現在、例えば、種々のサルモネラ種に対するいくつかのワクチンが商業的に入手可能である。しかし、これらのワクチンは、時には有効であるが、重大な欠点を有する。これらのワクチンは、一般に、野生型細菌の感染の場合と同等の抗体集団を誘導するため、被験者に過大な負荷を強いることになる。

この問題を解決するために、細菌の鞭毛に着目した研究もなされている。鞭毛は細胞表面から突き出た長い構造体であり、運動性および宿主細胞への侵入において重要な役割を果たす。鞭毛はフラジェリンと称されるタンパク質からなる。このフラジェリンタンパク質は高レベルの抗体を誘導することが知られている。サルモネラ（Ｓａｌｍｏｎｅｌｌａ　ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）の抗原性タンパク質フラジェリンは、ＭｃＣｌｅｌｌａｎｄ　Ｍ．ら，Ｎａｔｕｒｅ，４１３巻，８５２頁（２００１）に記載されている。コレラ（

Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）の抗原性タンパク質フラジェリンは、Ｈｅｉｄｅｒｂｅｒｇら，Ｎａｔｕｒｅ，４０６巻，４７７頁（２０００）に記載されている。また、赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ）の抗原性タンパク質フラジェリンは、Ｔｏｍｉｎａｇａ Ａ.ら，Ｇｅｎｅｓ Ｇｅｎｅｔ．Ｓｙｓｔ．，７６巻，１１１頁（２００１）に記載されている。しかし、このような鞭毛に対する抗体を用いる有効なワクチンは、未だ提供されていない。

【発明の開示】

【０００３】

本発明は、感染症を起こす細菌に由来するフラジェリンタンパク質のみでは感染症を発症しないため、このフラジェリンタンパク質をワクチンとして活用する手段の提供を目的とする。

本発明は、細菌感染性疾患に対する経口ワクチンを提供し、上記経口ワクチンは、カプセル製剤の形態であり、上記カプセル製剤は、カプセル皮膜と抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物とで構成され、上記カプセル皮膜は耐酸性であり、上記形質転換微生物は上記カプセル皮膜によって包含されている。

本発明はまた、細菌感染性疾患に対する経口ワクチンの第一の製造方法を提供し、この方法は、抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物を調製する工程；および上記形質転換微生物を耐酸性のカプセル皮膜によって封入して、耐酸性カプセル製剤を生成する工程；を含む。

本発明はまた、細菌感染性疾患に対する経口ワクチンの第二の製造方法を提供し、この方法は、抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物を調製する工程；上記形質転換微生物をカプセル皮膜によって封入して、カプセル製剤を生成する工程；および上記生成したカプセル製剤のカプセル皮膜を耐酸性にする工程；を含む。

一つの実施態様においては、上記抗原タンパク質フラジェリンは、上記微生物の菌体内に発現される。

別の実施態様においては、上記抗原タンパク質フラジェリンは、上記微生物の菌体外に分泌される。

一つの実施態様においては、上記微生物は、ビフィドバクテリウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ）属、ラクトバチルス（Ｌａｃｔｏｂａｃｉｌｌｕｓ）属、ラクトコッカス（Ｌａｃｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、ペディオコッカス（Ｐｅｄｉｏｃｏｃｃｕｓ）属、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属、エンテロコッカス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ）属、ロイコノストック（Ｌｅｕｃｏｎｏｓｔｏｃ）属、テトラゲノコッカス（Ｔｅｔｒａｇｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、エノコッカス（Ｏｅｎｏｃｏｃｃｕｓ）属、およびワイセラ（Ｗｅｉｓｓｅｌｌａ）属からなる群に属する微生物から選択される少なくとも１種である。

一つの実施態様においては、上記経口ワクチンは、腸チフス、コレラ、または赤痢に対するワクチンである。

一つの実施態様においては、上記カプセル製剤は、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、または硬カプセル製剤である。

本発明によれば、抗原性タンパク質であるフラジェリンを発現する形質転換微生物は、耐酸性カプセル製剤中に含有される。そのため、胃酸から形質転換微生物が保護され、生きた形質転換微生物を効果的に腸に送達することができる。この製剤は、腸内で溶解され、放出された形質転換微生物が抗原性を有するタンパク質であるフラジェリンを生産する。フラジェリン自体には感染性はないが、体内で抗体が生産される。特に、ビフィズス菌や乳酸菌などのいわゆる善玉菌といわれる腸内細菌を用いて形質転換微生物を調製したとき、腸内細菌が腸内で生育できる。従って、腸内でフラジェリンタンパク質が産生され、産生されたフラジェリンタンパク質を抗原として体内での抗体産生が誘導される。よって、感染症が抑制され得る。

従って、本発明によれば、抗体負荷の小さい細菌性感染症の予防および治療方法を提供することが可能となる。

【図面の簡単な説明】
【０００４】
図１は、プラスミドｐＢＬＥＳ１００の構造を示す模式図である。
図２は、フラジェリン発現ベクターとして調製されたｐＢＬＥＳ－ＦｌｉＣの構造を示す模式図である。
図３は、三層構造でなる、フラジェリン発現形質転換微生物を含有するシームレスカプセル製剤の構成を示す模式断面図である。
【発明を実施するための最良の形態】
【０００５】
本発明の細菌感染性疾患に対する経口ワクチンは、カプセル製剤の形態にある。本明細書中では、内容物をその中に含むカプセルを「カプセル製剤」という。本発明におけるカプセル製剤は、カプセル皮膜と抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物とで構成され、このカプセル皮膜は耐酸性である。耐酸性であるカプセル皮膜と抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物とで構成されるカプセル製剤とは、耐酸性のカプセル皮膜を有し、そして抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物をカプセル内容物として含有する限り、任意の構成および形状をとり、当該カプセル製剤が、さらなる構成要素を含んでいることを除外しない。したがって、抗原タンパク質フラジェリンを発現する形質転換微生物が、耐酸性のカプセル皮膜によって包含されている、または封じ込められている（すなわち、耐酸性の皮膜によって形成されるカプセルの内部領域に含有されている）。本明細書中では、このカプセル製剤を「耐酸性カプセル製剤」ともいう。
以下、経口ワクチンの調製のためのフラジェリン遺伝子の取得、フラジェリン発現ベクターの調製、フラジェリンを発現する形質転換微生物の調製、形質転換微生物を含有する耐酸性カプセル製剤の製造、および細菌感染性疾患に対する経口ワクチンについて、順に説明する。
１．フラジェリン遺伝子の取得
フラジェリンをコードする遺伝子は、公知の遺伝子配列に基づいて、入手可能である。フラジェリンをコードする遺伝子は、例えば、感染症病原細菌（例えば、サルモネラ、コレラ菌、または赤痢菌）から調製したゲノムＤＮＡあるいはｃＤＮＡを鋳型とし、該細菌のフラジェリンの構造遺伝子の配列情報に基づいて作製したプライマー対を用いてポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）で増幅し、取得し得る。
腸チフスのフラジェリンをコードする遺伝子は、ＭｃＣｌｅｌｌａｎｄ Ｍ．ら，Ｎａｔｕｒｅ，４１３巻，８５２頁（２００１）に記載されたサルモネラ（Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ）のフラジェリンの構造遺伝子配列から入手可能である。例えば、Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍの染色体ＤＮＡあるいはｃＤＮＡを鋳型とし、配列表の配列番号１および２の配列をプライマーとするポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）で増幅し、入手できる。
コレラのフラジェリンをコードする遺伝子は、Ｈｅｉｄｅｒｂｅｒｇら，Ｎａｔｕｒｅ，４０６巻，４７７頁（２０００）に記載されたコレラ菌（Ｖｉｂｒｉｏ ｃｈｏｌｅｒａｅ）のフラジェリンの構造遺伝子から入手可能である。例えば、Ｖ．ｃｈｏｌｅｒａｅの染色体ＤＮＡあるいはｃＤＮＡを鋳型とし、配列表の配列番号３および４の配列をプライマーとするＰＣＲで増幅し、入手できる。
赤痢のフラジェリンをコードする遺伝子は、Ｔｏｍｉｎａｇａ Ａ．ら，Ｇｅｎｅｓ Ｇｅｎｅｔ．Ｓｙｓｔ．，７６巻，１１１頁（２００１）に記載された赤痢菌（Ｓｈｉｇｅｌｌａ ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ）のフラジェリンの構造遺伝子から入手可能である。例えば、Ｓ．ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅの染色体ＤＮＡあるいはｃＤＮＡを鋳型とし、配列表の配列番号５および６の配列をプライマーとするＰＣＲで増幅し、入手できる。
２．フラジェリン発現ベクターの調製
上記１．のように調製されたフラジェリン遺伝子をプラスミドに導入し、発現ベクターを調製する。発現ベクターの調製に用いられるプラスミドとしては、腸内細菌で発現可能なプラスミドであれば特に制限はない。ビフィドバクテリウム（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅ

ｒｉｕｍ）属の微生物に由来するプラスミド（例えば、ｐＴＢ４、ｐＴＢ６、ｐＴＢ１０、ｐＢＬ６７またはｐＢＬ７８）、ストレプトコッカス（Ｓｔｒｅｐｔｏｃｏｃｃｕｓ）属の微生物に由来するプラスミド（例えば、プラスミドｐＣ１９４）などが用いられる。これらのプラスミドと大腸菌のプラスミドとの複合プラスミドもまた用いられる（例えば、特開平５－１３０８７６号公報参照）。

発現の安定性および形質転換株の調製のためのＤＮＡの調製の容易さという観点から、上記プラスミドの中でも、ビフィドバクテリウム・ロングム（Ｂ．ｌｏｎｇｕｍ）のプラスミドと大腸菌のプラスミドとから合成された複合プラスミドが好ましい。

発現ベクターは、形質転換株を選択する観点から、抗生物質耐性、アミノ酸要求性などの選択マーカーを有することが好ましい。

発現ベクターは、フラジェリンの発現のために、または発現に有利となるように、調節配列を付加したものが好ましい。調節配列としては、例えば、プロモーター配列、リーダー配列、プロペプチド配列、エンハンサー配列、シグナル配列、ターミネーター配列などが挙げられる。これらの調節配列は、腸内細菌で発現するものであれば、その由来は特に制限はない。

プロモーター配列としては、腸内細菌で発現するものであれば特に制限はない。発現効率の観点からは、ビフィドバクテリウム・ロングム（Ｂ．ｌｏｎｇｕｍ）のヒストン様タンパク（ＨＵ）のプロモーター配列（以下、ＨＵプロモーターということがある）が好ましく用いられる。例えば、Ｂ．ｌｏｎｇｕｍの染色体ＤＮＡあるいはｃＤＮＡを鋳型とし、配列表の配列番号７および８の配列をプライマーとして、配列表の配列番号９および１０のＨＵ遺伝子の配列（Ｂｉｏｓｃｉ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．６６（３），５９８－６０３（２００２））中、塩基配列１～１９２位の配列を増幅し、回収することにより、ＨＵプロモーター遺伝子が得られる。プライマー配列に適切な制限酵素部位（配列番号７ではＨｉｎｄＩＩＩ、配列番号８ではＮｃｏＩ）を付加することにより、容易に、プラスミドに組み込むことができる。

また、発現効率を高める観点からは、ターミネーター配列を有することが好ましい。ターミネーター配列としては、上記ＨＵ遺伝子のターミネーター配列が好ましく用いられ、配列表の配列番号９の４７５～６００位の塩基配列である。

その他、必要に応じて、リーダー配列、プロペプチド配列、エンハンサー配列、シグナル配列などを配置することができる。例えば、分泌のためのリーダー配列およびシグナル配列を備え、微生物菌体外にフラジェリンを分泌できるようにすることが好ましい。

このように、上記のプラスミドに、必要に応じて、プロモーター配列、ターミネーター配列などの調節配列、および選択マーカー遺伝子を導入して、クローニングベクターが調製される。クローニングベクターのプロモーターの下流には、マルチクローニングサイトを有するリンカーなどを備えていることが好ましい。このようなリンカーを用いることにより、フラジェリンをコードする遺伝子（ＤＮＡ）がプロモーターの下流に、かつ、インフレームでフラジェリンを発現することができるように、組み込まれる。

クローニングベクター用のプラスミドとしては、ｐＢＬＥＳ１００、ｐＢＬＥＭ１００などが挙げられる。図１にｐＢＬＥＳ１００の構造模式図を示す。このプラスミドｐＢＬＥＳ１００は、大腸菌のベクターｐＢＲ３２２由来のＰｓｔＩ－ＥｃｏＲＩ断片およびＰｓｔＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ断片（合計４．４ｋｂｐ：図１の直線部分）、Ｂ．ｌｏｎｇｕｍのベクターｐＴＢ６由来のＰｓｔＩ－ＰｓｔＩ断片（３．６ｋｂｐ：図１の黒帯部分）、ならびにエンテロコッカス・フェカーリス（Ｅｎｔｅｒｏｃｏｃｃｕｓ ｆａｅｃａｌｉｓ）由来のスペクチノマイシンアデニルトランスフェラーゼ（ｓｐｅｃｔｉｎｏｍｙｃｉｎ ａｄｅｎｙｌｔｒａｎｓｆｅｒａｓｅ：ＳｐＲ）をコードする領域（１．１ｋｂｐ：図１の白抜き矢印）を含む。

例えば、プラスミドｐＢＬＥＳ１００は、以下のようにして調製される。Ｂ．ｌｏｎｇｕｍ由来のプラスミドであるｐＴＢ６をＰｓｔＩで切断し、大腸菌のクローニングベクターｐＢＲ３２２（タカラバイオ社製）のＰｓｔＩ部位に導入する。さらに、エンテロコッカス・フェカーリスのＳｐＲをコードするＨｉｎｄＩＩＩ－ＥｃｏＲＩ断片領域をｐＢＲ

３２２のＥｃｏＲＩ－ＨｉｎｄＩＩＩ部位に挿入する。
このプラスミドｐＢＬＥＳ１００に上記取得したＨＵプロモーター配列およびフラジェリン遺伝子（以下、ＦｌｉＣ遺伝子ということがある）断片をインフレームで組み込むことにより、フラジェリンを発現するベクターが得られる。具体的に例示すると、ＮｃｏＩ切断部位を有する配列番号１の配列とＢａｍＨＩ切断部位を有する配列番号２の配列とを一対のプライマーとし、Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍの染色体ＤＮＡを鋳型としてＰＣＲで増幅し、増幅した断片をＮｃｏＩおよびＢａｍＨＩで切断し、フラジェリン遺伝子断片を調製する。他方で、ＨｉｎｄＩＩＩ部位を有する配列番号７のプライマーとＮｃｏＩ部位を有する配列番号８のプライマーとを一対のプライマーとし、Ｂ．ｌｏｎｇｕｍの染色体ＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、増幅した断片をＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｃｏＩで切断し、ＨＵプロモーター断片を調製する。これらの断片を、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＢａｍＨＩで切断したｐＢＬＥＳ１００とライゲーションすることにより、ＨＵプロモーター遺伝子（図２中「ｈｕｐＰ」）の下流にサルモネラのフラジェリン遺伝子（図２中「フラジェリン」）が組み込まれたフラジェリン発現ベクターｐＢＬＥＳ－ＦｌｉＣが得られる。この発現ベクターｐＢＬＥＳ－ＦｌｉＣを図２に示す。このような方法で得られるフラジェリン発現ベクターは、腸内細菌の形質転換に用いられる。

菌体外に分泌発現するためには、プラスミドｐＢＬＥＳ１００に分泌シグナルペプチド遺伝子断片およびフラジェリン遺伝子（ＦｌｉＣ遺伝子）断片をインフレームで組み込むことにより作製したベクターが用いられ得る。具体的に例示すると、ＮｃｏＩ切断部位を有する配列番号１の配列とＢａｍＨＩ切断部位を有する配列番号２の配列とを一対のプライマーとし、Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍの染色体ＤＮＡを鋳型としてＰＣＲで増幅し、増幅した断片をＮｃｏＩおよびＢａｍＨＩで切断し、フラジェリン遺伝子断片を調製する。他方で、ＨｉｎｄＩＩＩ部位を有する配列番号１１のプライマーとＮｃｏＩ部位を有する配列番号１２のプライマーとを一対のプライマーとし、Ｂ．ｂｉｆｉｄｕｍの染色体ＤＮＡを鋳型としてＰＣＲを行い、増幅した断片をＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｃｏＩで切断し、分泌シグナルペプチド遺伝子断片を調製する。これらの断片を、ＢａｍＨＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで切断したｐＢＬＥＳ１００と混合することにより、分泌シグナルペプチド遺伝子断片の下流にサルモネラのフラジェリン遺伝子が組み込まれたフラジェリン分泌型発現ベクターｐＢＬＥＳ－ＳＰ－ＦｌｉＣが得られる。このような方法で得られるフラジェリン発現ベクターは、腸内細菌の形質転換に用いられる。

３．フラジェリンを発現する形質転換微生物の調製

フラジェリンが発現される宿主の微生物としては、ヒトあるいは動物の大腸および小腸内で生育できる細菌（腸内細菌）であれば特に制限はない。宿主細菌が腸内で生育することにより、フラジェリンが発現される。発現されたフラジェリンは、腸から血液中に吸収され、抗原性を発揮し、抗体が惹起される。ビフィズス菌や乳酸菌などのいわゆる善玉菌といわれる腸内で生育可能な細菌（すなわち、腸内細菌）を好都合に利用し得る。

好ましい微生物としては、例えば、ビフィドバクテリウム属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ペディオコッカス属、ストレプトコッカス属、エンテロコッカス属、ロイコノストック属、テトラゲノコッカス属、エノコッカス属、およびワイセラ属に属する微生物が挙げられる（これらを総称して「乳酸菌」ともいう）。

ビフィドバクテリウム属に属する微生物（これらを総称して「ビフィズス菌」ともいう）としては、例えば、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス（Ｂｉｆｉｄｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｄｏｌｅｓｃｅｎｔｉｓ）、ビフィドバクテリウム・アングラタム（Ｂ．ａｎｇｕｌａｔｕｍ）、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシス・アニマリス（Ｂ．ａｎｉｍａｌｉｓ ｓｕｂｓｐ．ａｎｉｍａｌｉｓ）、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシス・ラクティス（Ｂ．ａｎｉｍａｌｉｓ ｓｕｂｓｐ．ｌａｃｔｉｓ）、ビフィドバクテリウム・アステロイデス（Ｂ．ａｓｔｅｒｏｉｄｅｓ）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（Ｂ．ｂｉｆｉｄｕｍ）、ビフィドバクテリウム・ボウム（Ｂ．ｂｏｕｍ）、ビフィドバクテリウム・ブレベ（Ｂ．ｂｒｅｖｅ）、ビフィドバクテリウム・カテヌラタム（Ｂ．ｃａｔｅｎｕｌａｔｕｍ）、ビフィドバクテリウム・ケリ

ナム（B. choerinum）、ビフィドバクテリウム・コリネフォーム（B. coryneforme）、ビフィドバクテリウム・クニクリ（B. cuniculi）、ビフィドバクテリウム・デンティコレンス（B. denticolens）、ビフィドバクテリウム・デンティウム（B. dentium）、ビフィドバクテリウム・ガリクム（B. gallicum）、ビフィドバクテリウム・ガリナラム（B. gallinarum）、ビフィドバクテリウム・グロボサム（B. globosum）、ビフィドバクテリウム・インディカム（B. indicum）、ビフィドバクテリウム・インファンティス（B. infantis）、ビフィドバクテリウム・イノピナタム（B. inopinatum）、ビフィドバクテリウム・ラクティス（B. lactis）、ビフィドバクテリウム・ロングム（B. longum）、ビフィドバクテリウム・マグナム（B. magnum）、ビフィドバクテリウム・メリシカム（B. merycicum）、ビフィドバクテリウム・ミニマム（B. minimum）、ビフィドバクテリウム・パーブロラム（B. parvulorum）、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラタム（B. pseudocatenulatum）、ビフィドバクテリウム・シュードロングム・サブスピーシス・グロボスム（B. pseudolongum subsp. globosum）、ビフィドバクテリウム・シュードロングム・サブスピーシス・シュードロングム（B. pseudolongum subsp. pseudolongum）、ビフィドバクテリウム・プロルム（B. pullorum）、ビフィドバクテリウム・ルミナル（B. ruminale）、ビフィドバクテリウム・ルミナンティアム（B. ruminantium）、ビフィドバクテリウム・セクラル（B. saeculare）、ビフィドバクテリウム・スカードビ（B. scardovii）、ビフィドバクテリウム・ズブチル（B. subtile）、ビフィドバクテリウム・スイス（B. suis）、ビフィドバクテリウム・サームアシドフィルム（B. thermacidophilum）、およびビフィドバクテリウム・サームフィルム（B. thermophilum）が挙げられる。

この中でも、ビフィドバクテリウム・アドレスセンティス（Bifidobacterium adolescentis）、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシス・アニマリス（B. animalis subsp. animalis）、ビフィドバクテリウム・アニマリス・サブスピーシス・ラクティス（B. animalis subsp. lactis）、ビフィドバクテリウム・ビフィダム（B. bifidum）、ビフィドバクテリウム・ブレベ（B. breve）、ビフィドバクテリウム・ラクティス（B. lactis）、ビフィドバクテリウム・ロングム（B. longum）、およびビフィドバクテリウム・シュードロングム・サブスピーシス・シュードロングム（B. pseudolongum subsp. pseudolongum）が好ましく用いられる。

ラクトバチルス属に属する微生物としては、例えば、ラクトバチルス・アシドフィルス（Lactobacillus acidophilus）、ラクトバチルス・アミロボラス（L. amylovorus）、ラクトバチルス・アニマリス（L. animalis）、ラクトバチルス・ブレビス（L. brevis）、ラクトバチルス・ブレビス・サブスピーシス・グラベセンシス（L. brevis subsp. gravesensis）、ラクトバチルス・ブフネリ（L. buchneri）、ラクトバチルス・ブルガリクス（L. bulgaricus）、ラクトバチルス・カゼイ（L. casei）、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシス・カゼイ（L. casei subsp. casei）、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシス・プランタラム（L. casei subsp. plantarum）、ラクトバチルス・カゼイ・サブスピーシス・トレランス（L. casei subsp. tolerans）、ラクトバチルス・セロビオサス（L. cellobiosus）、ラクトバチルス・カーバタス（L. curvatus）、ラクトバチルス・デルブルッキ（L. delbrueckii）、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシス・ブルガリクス（L. delbrueckii subsp. bulgaricus）、ラクトバチルス・デルブルッキ・サブスピーシス・デルブルッキ（L. delbrueckii subsp. delbrueckii）、ラクトバ

チルス・デルブルッキ・サブスピーシス・ラクティス（L. delbrueckii subsp. lactis）、ラクトバチルス・ディバージェンス（L. divergens）、ラクトバチルス・ファーメンタム（L. fermentum）、ラクトバチルス・フルクトサス（L. fructosus）、ラクトバチルス・ガセリ（L. gasseri）、ラクトバチルス・ヒルガルディ（L. hilgardii）、ラクトバチルス・ケフィール（L. kefir）、ラクトバチルス・ライヒマニイ（L. leicnmannii）、ラクトバチルス・パラカゼイ（L. paracasei）、ラクトバチルス・パラカゼイ・サブスピーシス・パラカゼイ（L. paracasei subsp. paracasei）、ラクトバチルス・ペントーサス（L. pentosus）、ラクトバチルス・プランタラム（L. plantarum）、ラクトバチルス・ロイテリ（L. reuteri）、ラクトバチルス・ラムノーザス（L. rhamnosus）、ラクトバチルス・サケイ（L. sakei）、ラクトバチルス・サケイ・サブスピーシス・サケイ（L. sakei subsp. sakei）、ラクトバチルス・サンフランシスコ（L. sanfrancisco）、ラクトバチルス・バチノステルクス（L. vaccinostrcus）、およびラクトバチルス・スピーシス（Lactobacillus sp.）が挙げられる。

ラクトコッカス属に属する微生物としては、例えば、ラクトコッカス・ガルビエ（Lactococcus garvieae）、ラクトコッカス・ラクティス（L. lactis）、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシス・ホードニエ（L. lactis subsp. hordniae）、ラクトコッカス・ラクティス・サブスピーシス・ラクティス（L. lactis subsp. lactis）、ラクトコッカス・プランタラム（L. plantarum）、およびラクトコッカス・ラフィノラクティス（L. raffinolactis）が挙げられる。

ペディオコッカス属に属する微生物としては、例えば、ペディオコッカス・ペントサセウス（Pediococcus pentosaceus）、およびペディオコッカス・アシディラクティシ（P. acidilacticii）が挙げられる。

ストレプトコッカス属に属する微生物としては、例えば、ストレプトコッカス・ボビス（Streptococcus bovis）、ストレプトコッカス・クレモリス（S. cremoris）、ストレプトコッカス・フェーカリス（S. faecalis）、ストレプトコッカス・ラクティス（S. lactis）、ストレプトコッカス・ピオジェネス（S. pyogenes）、およびストレプトコッカス・サーモフィラス（S. thermophilus）が挙げられる。

エンテロコッカス属に属する微生物としては、例えば、エンテロコッカス・カセリフラブス（Enterococcus casseliflavus）、およびエンテロコッカス・フェカーリス（E. faecalis）が挙げられる。

ロイコノストック属に属する微生物としては、例えば、ロイコノストック・シトリウム（Leuconostoc citreum）、ロイコノストック・メセンテロイデス（Leuconostoc mesenteroides）、ロイコノストック・メセンテロイデス・サブスピーシス・メセンテロイデス（L. mesenteroides subsp. mesenteroides）、およびロイコノストック・メセンテロイデス・サブスピーシス・デキストラニキュム（L. mesenteroides subsp. dextranicum）が挙げられる。

テトラゲノコッカス属に属する微生物としては、例えば、テトラゲノコッカス・ハロフィラス（Tetragenococcus halophilus）、およびテトラゲノコッカス・ミュリアティクス（T. muriaticus）が挙げられる。

エノコッカス属に属する微生物としては、例えば、エノコッカス・エニ（Oenococcus oeni）が挙げられる。

ワイセラ属に属する微生物としては、例えば、ワイセラ・ビリデセンス（Weissella vilidescens）が挙げられる。

フラジェリン発現ベクターの腸内細菌への導入方法に特に制限はなく、当業者が通常用

いる方法が用いられる。例えば、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、カルシウムイオンを用いる方法、プロトプラスト法などを挙げることができる。エレクトロポレーション法が好ましく用いられる。エレクトロポレーション法による場合、０．５～２０ｋＶ／ｃｍ、０．５μｓｅｃ～１０ｍｓｅｃの条件で行うことが可能である。より好ましくは、２～１０ｋＶ／ｃｍ、５０μｓｅｃ～５ｍｓｅｃで行うことが望ましい。

形質転換株は、フラジェリン発現ベクターが有する選択マーカーで選択される。形質転換株を培養する培地としては、宿主微生物それぞれに適した培地、例えば、ブドウ糖血液肝臓（ＢＬ）寒天培地、デ・マン－ロゴサ－シャープ（ＭＲＳ）寒天培地、岐阜大学嫌気性（ＧＡＭ）寒天培地、改良ＧＡＭ（ＴＧＡＭ）寒天培地、ブリッグス（Ｂｒｉｇｇｓ）寒天培地、および酵母エキスブドウ糖ペプトン（ＹＧＰ）寒天培地が挙げられる。これらの培地に選択マーカーに応じて抗生物質を添加し、あるいはアミノ酸を欠失または添加し、選択圧とする。

得られた形質転換微生物のフラジェリン発現の確認は、例えば、ウェスタンブロッティング法で行うことができる。まず、形質転換微生物を、例えば、非イオン性界面活性剤を用いて、溶菌する。非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタンエステル（Ｔｗｅｅｎ（登録商標）２０、４０、６０、６５、８０、８５）、ソルビタンエステル（Ｓｐａｎ（登録商標）２０、４０、６０、６５、８０、８５）などが挙げられる。次いで、リン酸緩衝液、クエン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（Ｔｒｉｓ）－塩酸緩衝液などを用いて希釈し、ドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）、トリス－グリシン－ポリアクリルアミドゲルなどを用いて電気泳動を行う。次いで、ニトロセルロース、ポリビニリデンフルオリド（ＰＶＦ）膜などに転写し、フラジェリンに対する抗体（免疫グロブリンＧ（ＩｇＧ））と反応させ、さらに蛍光標識を有する２次抗体で反応させることにより、フラジェリンの発現を確認できる。形質転換微生物のフラジェリン分泌発現は、形質転換株を選択した後に遠心分離して上清を得、この上清に対して上記と同様にしてウェスタンブロッティングを行うことにより確認し得る。

フラジェリンの発現が確認された形質転換微生物は、当業者が通常用いる方法により培養し、回収して、そのまま製剤の製造に用いてもよい。あるいは、乾燥して用いてもよい。乾燥は、凍結乾燥、低温乾燥などの低温処理を行い、腸内環境あるいは培地などの生育条件下に曝したときに生育可能となるような処理方法により行われる。

４．形質転換微生物を含有する耐酸性カプセル製剤の製造

フラジェリンタンパク質を発現する形質転換微生物が経口ワクチンとして機能するためには、この形質転換微生物が胃を通過し、腸に到達し、そこで生育できるようにしなければならない。ところで、胃のｐＨは１～３であり、この著しく低いｐＨのため、経口摂取された乳酸菌などの腸内細菌は、その大部分が死滅する。増殖能を有したまま腸まで達する腸内細菌は、一般に、投与量の１００００分の１以下となると言われている。従って、本発明で用いる形質転換微生物がヒトの腸内に生存したまま到達し、かつ、腸内で増殖してフラジェリンを発現するためには、形質転換微生物が胃酸による影響を極力受けないようにすることが必要である。

そのため、本発明においては、耐酸性のカプセル皮膜によって形質転換微生物が包含されまたは封じ込められている、すなわち、耐酸性の皮膜のカプセルの内側に形質転換微生物が含有されている、カプセル製剤とする。カプセル製剤の構成、形状などは、皮膜が胃酸に対して耐性を有する限り、特に制限がない。すなわち、胃酸がカプセル内に浸入し、形質転換微生物と接触しないように構成することが望ましい。カプセル皮膜は、ｐＨ４以下、好ましくはｐＨ１～３で溶解しない皮膜であり得る。カプセル化法も特に制限はない。

（シームレスカプセル製剤）

胃酸に対して耐性を付与するためのカプセルの形状としては、好ましくは、シームレスカプセルが挙げられる。「シームレスカプセル」とは、軟カプセルの一種であり、継ぎ目

のない皮膜で内容物を封入する形態のカプセルをいう。シームレスカプセルは、二層以上の多層構造が可能であり、三層またはそれ以上の多層構造を有することが好ましい。通常、最内層に内容物（本発明の場合は、形質転換微生物）を含み得、そして外層（または最外層）が皮膜となり得る。言い換えれば、形質転換微生物が皮膜によって包含された形態である。

以下に、三層構造のシームレスカプセル製剤の調製について説明する。図３は三層構造のシームレスカプセル製剤の模式断面図である。この三層構造は、最内層、この最内層を覆う内皮層、およびこの内皮層を覆う外層からなる。

最内層は、上記形質転換微生物、およびこの形質転換微生物を懸濁／混合するための非水性溶媒または固体成分（以下、この成分を最内層用物質という）からなる。最内層用物質には特に制限がない。例えば、各種油脂類、脂肪酸類、糖の脂肪酸エステル、脂肪族炭化水素、芳香族炭化水素、鎖状エーテル、高級脂肪酸エステル、高級アルコール、テルペン類が挙げられる。具体的には、大豆油、胡麻油、パーム油、パーム核油、コーン油、綿実油、椰子油、ナタネ油、カカオ脂、牛脂、豚脂、馬油、鯨油、融点が４０℃以下である上記天然油脂の水添油脂、マーガリン、ショートニング、グリセリン脂肪酸エステル、蔗糖脂肪酸エステル、樟脳油、薄荷油、α－ピネン、Ｄ－リモネンなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらの最内層用物質は、単独でまたは２種以上を混合して用いることができる。

内皮層の材料としては、上記最内層用物質のうち、融点が２０℃～５０℃であり、かつ最内層と異なる物質が用いられる。より好ましくは、常温で固体の物質が用いられる。以下の実施例において、最内層用物質として融点が３４℃の水添パーム核油、および内皮層の材料として融点が４３℃の水添パーム核油を用いたように、最内層用物質および内皮層の材料としてそれぞれ融点が異なるように水添処理された同種の油脂を用いることもできる。この内皮層は、水分および酸素の透過を抑制し、胃酸との接触を防ぐように働き得る。どのような物質を選択するかは、カプセルの保存期間などを考慮して決定することができる。

外層（三層構造以上の場合は最外層）の材料としては、タンパク質と水溶性多価アルコールとの混合物、タンパク質と水溶性多価アルコールと多糖類との混合物、多糖類と水溶性多価アルコールとの混合物などが挙げられる。タンパク質としては、例えば、ゼラチンおよびコラーゲンが挙げられる。水溶性多価アルコールとしては、例えば、ソルビトール、マンニトール、グリセリン、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコールが挙げられる。多糖類としては、寒天、ゲランガム、キサンタンガム、ローカストビーンガム、ペクチン、アルギン酸塩、カラギナン、アラビアガム、デキストリン、変性デキストリン、デンプン、化工デンプン、プルラン、ペクチン、およびカルボキシメチルセルロース塩が挙げられる。ペクチン、アルギン酸塩、ゲランガム、もしくはカラギナンを使用する場合は、適宜アルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩を添加してもよい。

上記の三層構造のシームレスカプセル製剤の調製は、当業者に周知の技術、例えば、特許第１３９８８３６号明細書に記載されている三重ノズルを用いる滴下法で行われる。この滴下法では、同心三重ノズルの最内側ノズルから形質転換微生物（例えば、凍結乾燥菌体）と合わせた最内層用物質（好ましくは、２０～５０℃で非流動性である疎水性溶媒物質中への形質転換微生物（好ましくは、凍結乾燥菌体）の懸濁液）を、中間ノズルから内皮層を構成する物質（例えば、常温では固体である物質の融解液）を、そして、最外側ノズルから外層（皮膜）となる物質の溶液を同時に吐出し、冷却下で流動しているキャリア液（例えば、コーン油、ナタネ油など）中に滴下させることにより、最内層に形質転換微生物が含まれる三層構造の「シームレス」カプセルが形成される。したがって、形質転換微生物が、継ぎ目のない外層皮膜によって包含または封じ込められている。

上記のようにして形成されたカプセルは、次いで乾燥される。乾燥方法としては、例えば、常温通風乾燥を施す。乾燥は、例えば５℃～３０℃の空気により乾燥させる方法が一般的である。乾燥時間は２～１２時間が好適である。特開平０７－０６９８６７号公報に記載される、上記のように通常の乾燥を施したカプセルに対し、さらに真空乾燥または真

空凍結乾燥を施す方法が好適に用いられ得る。真空度は０．５～０．０２ｔｏｒｒに保ち、真空凍結乾燥では－２０℃以下で凍結させ乾燥させる方法である。真空乾燥または真空凍結乾燥に要する時間は特に限定的ではないが、一般に５～６０時間、好ましくは２４～４８時間である。５時間以下であると、乾燥が不十分であり、カプセル内に存在する水分が内容物質に悪影響を与え得る。

特開平０７－０６９８６７号公報に記載の方法により得られるカプセルはそのカプセル内の水分が真空凍結乾燥により十分除去されており、Ａｗ値は０．２０以下で熱伝導率０．１６ｋｃａｌ／ｍｈ℃以下になり得る。真空乾燥または真空凍結乾燥によりもちろん水分が低下するのと同時に、カプセルが十分乾燥し、多孔質になるため、熱伝導率も単に通常乾燥で得られたものよりも大きく低下することになる。

Ａｗ値とは試料中に存在する水分の絶対量ではなく、水分の存在状態によって決定される値、すなわち試料中における水の自由度を表したものであって、化学反応や微生物の生育に直接関与することができる水分を表す指標で、電気抵抗式水分活性測定法（例えば、ＡｗメーターＷＡ－３６０、（株）芝浦電子製作所）で測定される。熱伝導率はフィッチ（Ｆｉｔｃｈ）法などで測定される。Ａｗ値は好ましくは０．２０以下であり、熱伝導率は好ましくは０．０２～０．０８ｋｃａｌ／ｍｈ℃である。

シームレスカプセル製剤のカプセル皮膜に耐酸性を付与するには、耐酸性の外層を形成させるか、または形成されたシームレスカプセルの皮膜（最外層）を耐酸性となるように処理する。

耐酸性外層を形成させる方法としては、ゲル化能を有するゼラチン、寒天、カラギナンなどに対して、ペクチン、アルギン酸塩、アラビアゴムなどを０．０１～２０質量％、好ましくは０．１～１０質量％となるように添加する方法が挙げられる。

形成されたシームレスカプセルの皮膜（最外層）に耐酸性を付与する方法としては、例えば、シームレスカプセルの外層（最外層）の架橋処理およびシームレスカプセルの表面のコーティング処理が挙げられる。これらの処理を単独でまたは組み合わせて行うことが好ましい。

タンパク質を含む外層を架橋処理する場合、まず、シームレスカプセルを調製した後、十分に水洗する。水洗したシームレスカプセルを、架橋剤を含む水溶液に加え、外層の表面を架橋させる。架橋剤としては、従来公知の架橋剤を使用することができる。架橋剤としては、例えば、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、プロピオンアルデヒド、グリオキサール、グルタルアルデヒド、シンナムアルデヒド、バニリルアルデヒド、アセトン、エチルメチルケトン、エチレンオキシド、プロピレンオキシド、カリミョウバン、およびアンモニウムミョウバンが挙げられる。一般には、シームレスカプセル１質量部を、０．１～２ｗ／ｖ％、好ましくは０．５～２ｗ／ｖ％の架橋剤を含む水溶液５０～１００質量部に加え、１０～３００秒間撹拌することにより、外層の処理を行う。なお、架橋剤の使用量、作用させる時間は、架橋剤によって異なる。外皮膜の表面を架橋処理した後、十分に水洗することにより、架橋剤を含む水溶液を除去し、外層中に含まれる水分を乾燥させる。

また、上記のタンパク質を含む外層の架橋処理として、トランスグルタミナーゼを用いる酵素処理による架橋を行ってもよい。この場合、生成したシームレスカプセル１質量部を、０．１～１０ｗ／ｖ％、好ましくは０．５～２ｗ／ｖ％の酵素を含む水溶液５０～１００質量部に加え、１～３００分間撹拌することにより、外層を処理し、上記と同様に水洗、乾燥させる。

コーティング処理を行う場合は、生成した湿シームレスカプセルを乾燥させた後、セラック、エチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、セルロースＴＣ－５、ビニルピロリドン－酢酸ビニル共重合体、ゼイン、エチレンワックスなどを基材とし、ヒマシ油、ナタネ油、ジブチルフタレート、ポリエチレングリコール、グリセリン、ステアリン酸、脂肪酸エステル、ソルビタンパルミテート、ポリオキシエチレンステアレート、アセチル化モノグリセリドなどを可塑剤として用いて、常法に従ってシームレスカプセルをコーティングする。

さらに、カプセル皮膜に腸溶性を付与することにより、胃内の酸性溶液（例えば、胃酸）などからカプセルを保護しそして腸内で崩壊させることにより、カプセル内部の形質転換微生物を腸内で放出させ、腸内で抗原産生を十分行わせることが可能となる。腸溶性の付与は、当業者が通常腸溶性カプセルを製造する方法で行われる。また、シームレスカプセルの外層材料としてゼラチンおよびペクチンを含む混合物を用いることにより、腸溶化皮膜とできる。ゲル化能を有するゼラチン、寒天、カラギナンなどに対して、ペクチン、アルギン酸塩、アラビアゴムなどを０．０１～２０質量％、好ましくは０．１～１０質量％となるように添加し、調製した耐酸性外層は、腸溶性もまた有する。

シームレスカプセル製剤は、その製法に起因して、形状は球状であり得る。シームレスカプセルの平均粒径は、０．３～１０ｍｍ、好ましくは、１．５～８．０ｍｍである。

このようにして得られたシームレスカプセル製剤は、室温で形質転換微生物の活性を保持したまま６ヶ月以上保存することが可能であり、１０℃以下で保存する場合は、１年以上の長期保存が可能である。

（軟カプセル製剤）

軟カプセル製剤は、シームレスカプセル製剤の場合と同様、非水性溶媒中への形質転換微生物の懸濁液を内容物とし、皮膜シートで包含したものである。皮膜シートの材料は、シームレスカプセルの外層の材料と同様である。

軟カプセル製剤は、公知の技術、例えば、特許第２９９９５３５号明細書に記載されている方法で調製することができる。例えば、ロータリーダイを用いて、内容物を注入および充填しながら、皮膜シートを型を通して加熱することによって封入し、カプセル化し得る。腸において形質転換微生物を放出する機能を持たせるために、得られた軟カプセルから、離型剤である油を極性溶媒（例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール）で洗浄することによって除去する。その後、シームレスカプセルの場合と同様に、架橋処理およびコーティング処理を組み合わせて行うか、あるいはいずれか一方の処理を行い、耐酸性とし得る。

耐酸性皮膜シートを、ゲル化能を有するゼラチン、寒天、カラギナンなどに対して、ペクチン、アルギン酸塩、アラビアゴムなどを０．０１～２０質量％、好ましくは０．１～１０質量％となるように添加し、公知の方法に基づいて調製することもできる。あるいは、皮膜シートを架橋処理およびコーティング処理を組み合わせて行うか、あるいはいずれか一方の処理を行い、耐酸性とし得る。このようにして得られた耐酸性皮膜シートを用いて、例えば、公知の技術によりカプセルの成形およびカプセル内への内容物の導入をし、次いでカプセルの継ぎ目を溶着することによって内容物を封入し、耐酸性皮膜によって形質転換微生物が包含された軟カプセル製剤を製造し得る。

軟カプセル製剤は、球状、楕円状、または矩形状の構造であり得る。軟カプセルは、長径が３～１６ｍｍおよび短径が２～１０ｍｍのものが好ましく、長径が５～７ｍｍおよび短径が２～３ｍｍのものがより好ましい。

このようにして得られた軟カプセル製剤は、室温で形質転換微生物の活性を保持したまま６ヶ月以上保存することが可能であり、１０℃以下で保存する場合は、１年以上の長期保存が可能である。

（硬カプセル製剤）

硬カプセル製剤は、カプセル皮膜を予めボディとキャップとに成型し、内容物をカプセルボディに充填し、次いでカプセルキャップを組み合わせることにより、製造され得る。

硬カプセル製剤の皮膜材料としては、ゼラチン、セルロース、プルラン、カラギナン、ならびに、ヒドロキシプロピルメチルセルロースなどのセルロース誘導体が挙げられる。硬カプセルの成型は、当業者が通常用いる方法で行われ得る。成型カプセルは、市販のカプセルであってもよい。内容物を皮膜で包み込み、封入することもできる。

内容物は、形質転換微生物を賦型剤（例えば、無水ケイ酸、合成ケイ酸アルミニウム、乳糖、コーンスターチ、結晶セルロース）とよく混合させたもの、あるいは、形質転換微生物の乾燥菌末を含有する粉体であり得る。

内容物をカプセル内に入れた後、カプセル皮膜をコーティングしてもよい。このコーテ

ィングには、シームレスカプセルの外層で説明した材料および方法が適用され、それにより耐酸性および好ましくは腸における崩壊性（腸溶性）が付与される。このコーティングは、カプセル皮膜を封入して内容物を包含させる役割も有し得る。

耐酸性皮膜シートを、ゲル化能を有するゼラチン、寒天、カラギナンなどに対して、ペクチン、アルギン酸塩、アラビアゴムなどを０．０１～２０質量％、好ましくは０．１～１０質量％となるように添加し、公知の方法に基づいて調製することもできる。あるいは、皮膜シートを架橋処理およびコーティング処理を組み合わせて行うか、あるいはいずれか一方の処理を行い、耐酸性とし得る。このようにして得られた耐酸性皮膜シートを用いて、例えば、公知の技術で硬カプセルを成型し得、そしてこの成型した硬カプセル内部に内容物を入れて、カプセルの継ぎ目を溶着することによって内容物を封入し、耐酸性皮膜によって形質転換微生物が包含された硬カプセル製剤を製造し得る。

このようにして得られた硬カプセル製剤では、室温で形質転換菌の活性を保持したまま６ヶ月以上保存することが可能であり、１０℃以下で保存する場合は、１年以上の長期保存が可能である。

５．細菌感染性疾患に対する経口ワクチン

上記４．で調製された耐酸性カプセル製剤（シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤）は、経口投与され、ｐＨ１～３の胃内を通過して、腸に到達し、腸で溶解される。溶解により、製剤から放出された形質転換微生物は、腸内環境で生育し、フラジェリンを生産し、好ましくは菌体外に分泌する。フラジェリンは腸から吸収され、抗原と認識されて、抗体が生産される。従って、フラジェリンを有する微生物に対して有効な経口ワクチンとなる。

【実施例】

【０００６】

以下に実施例を挙げて本発明を説明するが、本発明は、これらの実施例により限定されるものではない。

（実施例１：腸チフス抗原を産生するビフィズス菌を含有する耐酸性カプセル製剤の調製）

Ａ．ＰＣＲによるＳ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ由来のフラジェリン遺伝子の増幅

Ｓ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ　ＡＴＣＣ　１４０２８をＬＢ培地（インビトロジェン株式会社製）で３７℃にて１２時間培養した。培養終了後、常法によりＳ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍのゲノムＤＮＡを抽出した。抽出したゲノムＤＮＡを、ＰＣＲ反応キット（アプライドバイオシステムズ社製）の取扱説明書に従って、０．５ｕｎｉｔｓのＡｍｐｌｉＴａｑ　ＤＮＡ　ポリメラーゼを用いて増幅させた。プライマーとして、配列表の配列番号１（ｆｏｒｗａｒｄ）：５’－ＣＡＴＧＣＣＡＴＧＧＡＴＧＧＣＡＣＡＧＴＣＡＴＴＡＡＴＡＣＡ－３’（５位から１０位までのＣＣＡＴＧＧはＮｃｏＩ切断部位である）、および配列番号２（ｒｅｖｅｒｓｅ）：５’－ＣＧＣＧＧＡＴＣＣＴＴＡＡＣＧＣＡＧＴＡＡＡＧＡＧＧＡＣ－３’（５位から１０位までのＧＡＴＣＣＴはＢａｍＨＩ切断部位である）を用いた。ＰＣＲは、鋳型ＤＮＡを１２５ｎｇ、プライマーを各０．５μｍｏｌ、Ｐｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼを２．５ｕｎｉｔｓ、Ｐｆｕ　ＤＮＡポリメラーゼ用×１０緩衝液を４μＬ、ｄＮＴＰを各２００μｍｏｌ含む反応液４０μＬを用い、９４℃で１分、５５℃で１分、７２℃で１分の工程を３０回繰り返した後、７２℃で１０分保温する条件で行った。ＰＣＲの終了後、ＮｃｏＩおよびＢａｍＨＩで切断し、フラジェリン遺伝子断片を調製した。

Ｂ．ＰＣＲによるＨＵプロモーターの増幅

Ｂ．ｌｏｎｇｕｍ　ＡＴＣＣ　１５７０３株をＭＲＳ培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）で３７℃にて１２時間培養した。培養終了後、常法によりＢ．ｌｏｎｇｕｍのゲノムＤＮＡを抽出した。上記Ａ．と同様の条件でＰＣＲを行った。用いたプライマーは配列番号７（ｆｏｒｗａｒｄ）：５’－ＣＧＣＣＡＡＧＣＴＴＴＧＧＧＣＧＣＧＧＣＧＧＣＣＡＴＧＡＡＧ－３’（５位から１０位までのＡＡＧＣＴＴはＨｉｎｄＩＩＩ切断部位である）、および配列番号８（ｒｅｖｅｒｓｅ）：５’－ＣＧＣＧＣＣＡＴＧＧＡ

ＡＡＧＣＡＴＣＣＴＴＣＴＴＧＧＧＴＣＡ－３’（５位から１０位までのＣＣＡＴＧＧはＮｃｏＩ切断部位である）を用いた。ＰＣＲの終了後、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｃｏＩで切断し、ＨＵプロモーター遺伝子断片を調製した。

Ｃ．発現ベクターの調製

プラスミドｐＢＬＥＳ１００をＢａｍＨＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで切断し、上記Ａ．で得られたサルモネラのフラジェリン遺伝子断片およびＢ．で得られたＨＵプロモーター遺伝子断片と混合してライゲーションすることにより、発現ベクターｐＢＬＥＳ－ＦｌｉＣを得た。

Ｄ．発現ベクターのＢ．ａｎｉｍａｌｉｓへの導入

Ｂ．ａｎｉｍａｌｉｓ　ＡＴＣＣ　２７５３６を、ＭＲＳ培地に植菌し、３７℃にて１２時間、炭酸ガス１０％を含む窒素ガス環境中で対数増殖期中期まで静置培養した。得られた培養液を遠心分離して菌体を回収し、ＰＢＳ（塩化ナトリウムを８ｇ、塩化カリウムを０．２ｇ、リン酸水素二ナトリウムを１．４４ｇ、リン酸二水素カリウム０．２４ｇを１Ｌの蒸留水で希釈しｐＨ７．４としたもの）で、３回洗浄した。次いで、５×１０^{8}ｃｅｌｌｓ／ｍＬとなるようにＰＢＳを加えて、Ｂ．ａｎｉｍａｌｉｓの懸濁液を得た。この懸濁液５０μＬ中に、上記Ｂ．で調製したｐＢＬＥＳ－ＦｌｉＣを５μＬ（１μｇＤＮＡ／５μＬ）加え、これを０．２ｃｍ幅のエレクトロポレーション用キュベットに入れて、５μｓ、１０００Ｖの条件にて形質転換を行った。

スペクチノマイシン（５０μｇ／ｍｌ）含有ＢＬ寒天培地（日水製薬株式会社製）で、３７℃にて炭酸ガス１０％を含む窒素ガス環境中で培養することにより、形質転換されたＢ．ａｎｉｍａｌｉｓを得た。

Ｅ．ウェスタンブロッティング

形質転換されたＢ．ａｎｉｍａｌｉｓが、フラジェリンタンパク質が発現するか否かを、以下のように確認した。Ｂ．ａｎｉｍａｌｉｓを１ｗ／ｖ％Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０を含むリン酸緩衝液（ｐＨ６．８）、および緩衝液Ａ（トリス塩酸塩１２６ｍＭ、２０ｗ／ｖ％グリセリン、４ｗ／ｖ％ドデシル硫酸ナトリウム、１．０ｗ／ｖ％２－メルカプトエタノール、０．０５ｗ／ｖ％ブロモフェノールブルー、ｐＨ６．８）で希釈した。そのうちの５μｇを電気泳動（トリスグリシンポリアクリルアミドゲル）にかけた。分離したタンパク質をニトロセルロース膜にエレクトロブロットした。次いで、サルモネラ菌種に共通のフラジェリンに特有のＩｇＧ１（ビロスタット社製）およびホースラディッシュペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）標識した２次抗体（１：５００）を用いるＥＬＩＳＡで、フラジェリンの発現を確認した。

Ｆ．形質転換微生物の凍結乾燥菌末の調製

形質転換されたビフィズス菌（Ｂ．ａｎｉｍａｌｉｓ）の２白金耳を、５０μＭのスペクチノマイシンを含むＭＲＳ培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）１Ｌに植菌し、３７℃にて１８時間、炭酸ガス１０％を含む窒素ガスを吹き込みながら培養した。途中、ｐＨの低下が見られるので、ｐＨ自動調整器を用いて１０Ｍ水酸化ナトリウム水溶液でｐＨを５．５に調整を行いながら培養した。１５時間培養後の菌数は、得られた菌液を適度に嫌気性希釈液で希釈し、５０μＭのスペクチノマイシンを含むＢＬ寒天培地に塗布し、コロニーの生育数により求めた。なお、嫌気性希釈液は、リン酸水素二ナトリウム６．０ｇ、リン酸二水素カリウム４．５ｇ、Ｌ－システイン塩酸塩０．５ｇ、Ｔｗｅｅｎ（登録商標）８０を０．５ｇ、および寒天１．０ｇを１Ｌの蒸留水に溶解させ、１２１℃にて１５分間蒸気滅菌したものである。

培養後、遠心分離（１５０００×ｇ、２０分）し、菌体を回収した。得られた菌体に蒸留水１２０ｇ、クエン酸Ｎａを１２ｇ、リンゴ酸Ｎａを８ｇ加えて菌体を懸濁させた。この懸濁液に、アビセルＦＤ－１０１（旭化成株式会社）を８ｇ添加し、良く撹拌した後、凍結させ、真空乾燥した。その後、得られた粉体に対して２倍量のデキストリンを加え、凍結乾燥菌末を得た。

Ｇ．耐酸性シームレスカプセル製剤の調製

以下に説明するように、同心三重ノズルを備えたカプセル製造装置を用いて、形質転換

菌体を含有する耐酸性シームレスカプセル製剤を調製した。

硬化油（融点３４℃の水添パーム核油）４００ｇを融解し、これに上記Ｆ．で得られた凍結乾燥菌末１００ｇを分散させた。この分散物を同心三重ノズルの内側ノズルから、その外側の中間ノズルから融解した硬化油（融点４３℃の水添パーム核油）を、さらに最外側ノズルからゼラチン溶液（ゼラチン６００ｇ、グリセリン３００ｇ、およびペクチン１００ｇを精製水４ｋｇに溶解させたもの）を同時に吐出し、１５℃冷却下で流動しているナタネ油中に滴下させることにより、直径２．５ｍｍの三層構造のシームレスカプセル内に形質転換菌体が包含された製剤を調製した。このカプセル製剤を２０℃にて１０時間、通気乾燥した後、更に常温にて真空乾燥を行うことにより、カプセル中の水分活性をＡｗ値０．２０以下および熱伝導率０．１６ｋｃａｌ／ｍｈ℃以下にまで低下させた。

Ｈ．耐酸性軟カプセル製剤の調製

上記Ｆ．で得られた凍結乾燥菌末５０ｇをナタネ油３００ｇに懸濁させて、軟カプセルの内容液を調製した。ゼラチン４００ｇおよびグリセリン１００ｇを蒸留水２００ｇに加えて、６０℃で撹拌して溶解させ、これをシート状に成形することによりゼラチン膜を得、これを軟カプセルの皮膜として用いた。このゼラチン膜を、一対の回転円筒型金型の間に送り、これと連動するポンプで内容液をゼラチン膜間に噴出することにより、カプセル化した。

得られたカプセル化物４００ｇを転動造粒器に入れ、セラック１０ｇおよびヒマシ油１ｇをメタノール－酢酸エチル（１：１、ｖ／ｖ）混液４００ｇに溶解させた溶液を、軟カプセルの全表面にコーティング膜厚０．３ｍｍとなるように噴霧した。このようにして、長径４ｍｍおよび短径３ｍｍの大きさで、形質転換菌体を包含しかつ耐酸性のコーティングされた軟カプセル製剤を４００ｇ得た。

Ｉ．耐酸性硬カプセル製剤の調製

上記Ｆ．で得られた凍結乾燥菌末を、硬カプセルの内容物とした。硬カプセル皮膜としては、市販の局方５号のカプセルを用いた。この内容物をカプセルのボディに充填し、これにキャップを合わせることにより、カプセル化した。

得られたカプセル化物１００ｇを転動造粒器に入れ、セラック１０ｇおよびヒマシ油１ｇをメタノール－酢酸エチル（１：１、ｖ／ｖ）混液４００ｇに溶解させた溶液を、硬カプセルの全表面にコーティング膜厚０．３ｍｍとなるように噴霧し、形質転換菌体を包含しかつ耐酸性のコーティングされた硬カプセル製剤１００ｇを得た。

（実施例２　コレラ抗原を産生する乳酸菌を含有する耐酸性カプセル製剤の調製）

コレラ抗原を産生するＶ．ｃｈｏｌｅｒａｅ　ＡＴＣＣ　１１６２８をＬＢ培地で、３７℃にて１２時間培養した。培養終了後、常法によりＶ．ｃｈｏｌｅｒａｅのゲノムＤＮＡを抽出した。配列番号３（ｆｏｒｗａｒｄ）および配列番号４（ｒｅｖｅｒｓｅ）の配列をプライマーとし、抽出したゲノムＤＮＡを鋳型として、実施例１と同様にＰＣＲを行った。得られた増幅断片を回収し、ＮｃｏＩおよびＢａｍＨＩで切断し、コレラフラジェリン遺伝子断片を調製した。実施例１で調製したｐＢＬＥＳ－ＦｌｉＣをＮｃｏＩおよびＢａｍＨＩで消化し、大きい断片を回収した。この断片とコレラフラジェリン遺伝子断片とをライゲーションすることにより、コレラ抗原を発現する発現ベクターｐＢＬＥＳ－Ｖｃを得た。

得られたコレラフラジェリンの発現ベクターｐＢＬＥＳ－Ｖｃを用いてＬｂ．ｐｌａｎｔａｒｕｍ　ＡＴＣＣ　ＢＡＡ－７９３を形質転換し、コレラ抗原を産生するＬｂ．ｐｌａｎｔａｒｕｍを得た。コレラ抗原の発現は、実施例１のＥ．に記載と同様に、抗原抗体反応を用いるＥＬＩＳＡによって、確認した。

コレラのフラジェリンタンパク質の発現が確認されたＬｂ．ｐｌａｎｔａｒｕｍを用いて、実施例１のＦ．と同様の方法で凍結乾燥菌末を調製し、そしてこの凍結乾燥菌末を含有するシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤をそれぞれ実施例１のＧ．、Ｈ．およびＩ．と同様にして調製した。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性である。

（実施例３　赤痢抗原を産生するビフィズス菌を含有する耐酸性カプセル製剤の調製）

赤痢抗原を産生するＳ．ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅ ＡＴＣＣ ２９０２６をＬＢ培地で３７℃にて１２時間培養した。培養終了後、常法によりＳ．ｄｙｓｅｎｔｅｒｉａｅのゲノムＤＮＡを抽出した。配列番号５（ｆｏｒｗａｒｄ）および配列番号６（ｒｅｖｅｒｓｅ）の配列をプライマーとし、抽出したゲノムＤＮＡを鋳型として、実施例１と同様にＰＣＲを行った。得られた増幅断片を回収し、ＮｃｏＩおよびＢａｍＨＩで切断し、赤痢フラジェリン遺伝子断片を調製した。実施例１で調製したｐＢＬＥＳ－ＦｌｉＣをＮｃｏＩおよびＢａｍＨＩで消化し、大きい断片を回収した。この断片と赤痢フラジェリン遺伝子断片をライゲーションすることにより赤痢抗原を発現する発現ベクターｐＢＬＥＳ－Ｓｄを得た。

得られた赤痢フラジェリン発現ベクターｐＢＬＥＳ－Ｓｄを用いてＢ．ｌｏｎｇｕｍ ＡＴＣＣ １５６９７を形質転換し、赤痢抗原を産生するＢ．ｌｏｎｇｕｍを得た。赤痢抗原の発現は、実施例１のＥ．に記載と同様に、抗原抗体反応を用いるＥＬＩＳＡによって、確認した。

赤痢のフラジェリンタンパク質の発現が確認されたＢ．ｌｏｎｇｕｍを用いて、実施例１のＦ．と同様の方法で凍結乾燥菌末を調製し、そしてこの凍結乾燥菌末を含有するシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤をそれぞれ実施例１のＧ．、Ｈ．およびＩ．と同様にして調製した。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性である。

（比較例１）

実施例１のＧ．において、皮膜となるゼラチン溶液の組成をゼラチン６００ｇ、グリセリン３００ｇ、およびソルビトール１００ｇを精製水４ｋｇに溶解させたものに変更したこと以外は、実施例１と同様の操作を行うことにより、シームレスカプセル製剤を調製した。得られた製剤の皮膜は、耐酸性でない。

（比較例２）

実施例１のＨ．軟カプセルの調製においてコーティングを行わないこと以外は、実施例１と同様の操作を行い、軟カプセル製剤を調製した。得られた製剤の皮膜は、耐酸性でない。

（比較例３）

実施例１のＩ．硬カプセルの調製においてコーティングを行わないこと以外は、実施例１と同様の操作を行い、硬カプセル製剤を調製した。得られた製剤の皮膜は、耐酸性でない。

（比較例４～６）

微生物を実施例２で調製したコレラのフラジェリン発現形質転換微生物に代えたこと以外は、比較例１～３と同様にして、それぞれ、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤を調製し、比較例４～６とした。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性でない。

（比較例７～９）

微生物を実施例３で調製した赤痢菌のフラジェリン発現形質転換微生物に代えたこと以外は、比較例１～３と同様にして、それぞれ、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤を調製し、比較例７～９とした。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性でない。

（実施例４：腸チフスのフラジェリンタンパク質発現形質転換微生物（組換えＢ．ａｎｉｍａｌｉｓ）投与による抗体惹起の確認）

８～１２週齢のＢＡＬＢ／ｃ雌マウス（日本チャールス・リバー株式会社）を購入し、標準飼料で１週間馴化した。マウスを９群（一群５～７匹）に分け、３群には、実施例１で調製した腸チフスのフラジェリンを発現する形質転換微生物を含有するシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤をそれぞれ経口投与した。別の３群には、比較例１～３で調製した腸チフスのフラジェリンを発現する形質転換微生物を含有する、耐酸性のないシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤を、それぞれ経口投与した。さらに、残りの３群には、対照として、フラジェリンを発現する形質

転換微生物（組換えＢ．ａｎｉｍａｌｉｓ）生菌、宿主のＢ．ａｎｉｍａｌｉｓ生菌、およびリン酸緩衝液をそれぞれ投与した。これらのカプセル製剤、生菌などを、１日１回、３週間摂取させた。

３週間後、血清中および便中のＩｇＡの量を以下の方法により測定した。９６穴プレート（Ｎｕｎｃ　Ｉｍｍｕｎｏｐｌａｔｅ　Ｍａｘｉｓｏｒｂ　Ｆ９６、ナルジェ　ヌンクインターナショナル株式会社製）に、フラジェリン抗原を含むＰＢＳを添加して、４℃にて１６時間、プレート表面をコーティングした。その後、牛血清アルブミン１ｗ／ｖ％を含むＰＢＳで、室温で２時間ブロッキングした。ＰＢＳで３回洗浄した後、血清あるいは便サンプルを加え、室温で３時間反応させた。ＰＢＳで３回洗浄した後、二次抗体（ヤギ由来－抗マウスＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＭ（サンタクルズ社製）を加え、室温で３時間インキュベートした。ＰＢＳで３回洗浄した後、三次抗体（フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）標識－ウサギ由来－抗ヤギＩｇＧ（ＱＥＤバイオサイエンス株式会社製）を加え、室温で３時間インキュベートした。蛍光を、ＦｌｕｏｒｏｓｃａｎＩＩ（大日本製薬株式会社製）で測定した。得られた蛍光値を表１に示す。

【表１】

表１

投与サンプル	BALB/c数	1日投与量 10^7 cfu/日	便中IgA量 (OD±標準誤差)	血清中IgA量 (OD±標準誤差)
実施例１:シームレスカプセル	7	2.5	0.16±0.012	0.40±0.145
実施例１:軟カプセル	7	3.2	0.15±0.013	0.38±0.151
実施例１:硬カプセル	7	3	0.14±0.014	0.37±0.120
比較例1:シームレスカプセル	5	2.5	0.05±0.011	0.12±0.038
比較例２:軟カプセル	5	3.2	0.06±0.010	0.14±0.041
比較例3:硬カプセル	5	3	0.06±0.010	0.13±0.028
形質転換微生物生菌	5	2.5	0.04±0.012	0.11±0.041
宿主微生物生菌	5	12	0.02±0.008	0.10±0.038
リン酸緩衝液	5	－	0.02±0.006	0.14±0.032

実施例１で得られた耐酸性のシームレスカプセル、軟カプセル、および硬カプセルの各製剤を摂取させた場合、いずれの形態の耐酸性カプセル製剤を用いても、耐酸性ではない比較例のカプセル製剤１～３、または生菌のみを摂取させた例に比べて、便中、血中ともにＩｇＡ量が多く、抗体を惹起させる効果が高いことが分かった。

（実施例５：コレラのフラジェリン発現形質転換微生物投与による抗体惹起の確認）

実施例２で得たコレラのフラジェリン発現形質転換微生物（組換えＬｂ．ｐｌａｎｔａｒｕｍ）を含むシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤、ならびに比較例４～６のカプセル製剤について、実施例４と同様にして、抗体惹起の確認を行った。

また、対照として、コレラのフラジェリンを発現する形質転換微生物生菌、宿主のＬｂ．ｐｌａｎｔａｒｕｍ生菌、およびリン酸緩衝液をそれぞれ投与した。結果を表２に示す。

【表２】

表２

投与サンプル	BALB/c数	1日投与量 10^7 cfu/日	便中IgA量 (OD±標準誤差)	血清中IgA量 (OD±標準誤差)
実施例2:シームレスカプセル	7	2.8	0.15±0.012	0.42±0.133
実施例2:軟カプセル	7	3.3	0.13±0.013	0.41±0.142
実施例2:硬カプセル	7	3.2	0.13±0.014	0.39±0.140
比較例4:シームレスカプセル	5	2.8	0.05±0.011	0.13±0.038
比較例5:軟カプセル	5	3.3	0.06±0.010	0.12±0.052
比較例6:硬カプセル	5	3.2	0.06±0.010	0.11±0.028
形質転換微生物生菌	5	2.8	0.03±0.012	0.12±0.032
宿主微生物生菌	5	8.3	0.02±0.008	0.10±0.022
リン酸緩衝液	5	–	0.02±0.006	0.15±0.033

実施例２で得られた耐酸性のシームレスカプセル、軟カプセル、および硬カプセルの各製剤を摂取させた場合、いずれの形態の耐酸性カプセル製剤を用いても、耐酸性ではない比較例４～６のカプセル製剤、生菌のみを摂取させた例に比べて、便中、血中ともにＩｇＡ量が多く、抗体を惹起させる効果が高いことが分かった。

（実施例６：赤痢のフラジェリン発現形質転換微生物投与による抗体惹起の確認）

赤痢菌のフラジェリン発現形質転換微生物（組換えＢ．ｌｏｎｇｕｍ）を含む実施例３で得たシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤、ならびに比較例７～９のカプセル製剤について、実施例４と同様にして、抗体惹起の確認を行った。

また、対照として、赤痢のフラジェリンを発現する形質転換微生物生菌、宿主のＢ．ｌｏｎｇｕｍ生菌、およびリン酸緩衝液をそれぞれ投与した。結果を表３に示す。

【表３】

表３

投与サンプル	BALB/c数	1日投与量 10^7 cfu/日	便中IgA量 (OD±標準誤差)	血清中IgA量 (OD±標準誤差)
実施例3:シームレスカプセル	7	3.2	0.13±0.012	0.38±0.142
実施例3:軟カプセル	7	3.9	0.12±0.013	0.37±0.153
実施例3:硬カプセル	7	4	0.13±0.014	0.39±0.131
比較例7:シームレスカプセル	5	3.2	0.06±0.011	0.11±0.038
比較例8:軟カプセル	5	3.9	0.05±0.010	0.12±0.051
比較例9:硬カプセル	5	4	0.06±0.010	0.11±0.028
形質転換微生物生菌	5	3.2	0.02±0.012	0.11±0.038
宿主微生物生菌	5	10.1	0.03±0.008	0.13±0.036
リン酸緩衝液	5	–	0.03±0.006	0.14±0.031

実施例３で得られた耐酸性のシームレスカプセル、軟カプセル、および硬カプセルの各製剤を摂取させた場合、いずれの形態の耐酸性カプセル製剤を用いても、耐酸性ではない比較例７～９のカプセル製剤、生菌のみを摂取させた例に比べて、便中、血中ともにＩｇ

Ａ量が多く、抗体を惹起させる効果が高いことが分かった。

（実施例７：腸チフス抗原を菌体外に分泌するビフィズス菌を含有する耐酸性カプセル製剤の調製）

Ａ．ＰＣＲによるＳ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ由来のフラジェリン遺伝子の増幅

実施例１のＡ．に記載の方法と同様にしてＳ．ｔｙｐｈｉｍｕｒｉｕｍ由来のフラジェリン遺伝子断片を調製した。

Ｂ．ＰＣＲによる分泌シグナルペプチドＤＮＡの増幅

Ｂ．ｂｉｆｉｄｕｍ　ＡＴＣＣ　２９５２１をＭＲＳ培地（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社製）で３７℃にて１２時間培養した。培養終了後、常法によりＢ．ｂｉｆｉｄｕｍのゲノムＤＮＡ（Ａｃｃｅｓｓ＃　ＡＪ２２４４３５）を抽出した。実施例１のＡ．と同様にＰＣＲを行った。本ＰＣＲでは、Ｂ．ｂｉｆｉｄｕｍのゲノムＤＮＡを鋳型として、配列表の配列番号１１（ｆｏｒｗａｒｄ）：５’－ＣＧＧＣＡＡＧＣＴＴＴＡＴＧＧＧＧＡＴＡＣＡＧＧＡＴＴＧＧＣＧＡＴ－３’（５位から１０位までのＡＡＧＣＴＴはＨｉｎｄＩＩＩ切断部位である）および配列番号１２（ｒｅｖｅｒｓｅ）：５’－ＧＣＧＣＣＣＡＴＧＧＡＡＡＴＣＧＧＧＴＧＧＣＧＴＣＣＴＣＧＡＣＣＧ－３’（５位から１０位までのＣＣＡＴＧＧはＮｃｏＩ切断部位である）のプライマー対を用いた。ＰＣＲの終了後、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＮｃｏＩで切断し、分泌シグナルペプチド遺伝子断片を調製した。

Ｃ．分泌型発現ベクターの調製

プラスミドｐＢＬＥＳ１００をＢａｍＨＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで切断し、上記Ａ．で得られたフラジェリン遺伝子断片および上記Ｂ．で得られた分泌シグナルペプチド遺伝子断片と混合してライゲーションすることにより、分泌型発現ベクターｐＢＬＥＳ－ＳＰ－Ｆｌｉｃを得た。

Ｄ．分泌型発現ベクターのＢ．ｂｒｅｖｅへの導入

発現ベクターとして上記Ｃ．で得られたｐＢＬＥＳ－ＳＰ－Ｆｌｉｃ、そして形質転換されるべき菌体としてＢ．ｂｒｅｖｅ　ＡＴＣＣ　１５７００を用いたこと以外は、実施例１のＤ．と同様にして形質転換を行い、形質転換Ｂ．ｂｒｅｖｅを得た。

Ｅ．分泌の確認

上記Ｄ．で得られた形質転換Ｂ．ｂｒｅｖｅを、大理石含ＭＲＳブロス培地で３７℃にて１２時間培養した後、４℃にて１２，０００ｒｐｍで遠心分離し、上清を得た。遠心上清について、上記実施例１のＥ．の記載と同様にウェスタンブロッティングを行い、形質転換Ｂ．ｂｒｅｖｅによるフラジェリンタンパク質の菌体外分泌を確認した。

Ｆ．形質転換微生物の凍結乾燥菌末の調製

腸チフスフラジェリンの分泌が確認されたＢ．ｂｒｅｖｅを用いて、実施例１のＦ．と同様の方法で凍結乾燥菌末を調製した。

Ｇ．耐酸性のシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の調製

上記Ｆ．で得られた凍結乾燥菌末を用いて、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤をそれぞれ実施例１のＧ．、Ｈ．およびＩ．の方法にしたがって調製した。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性である。

（比較例１０～１２）

微生物を実施例７の腸チフスのフラジェリン分泌発現形質転換微生物に代えたこと以外は、比較例１～３と同様にして、それぞれ、シームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤を調製し、比較例１０～１２とした。得られたシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤および硬カプセル製剤の皮膜は、耐酸性でない。

（実施例８）

実施例７で得た腸チフスのフラジェリン分泌発現形質転換微生物（組換えＢ．ｂｒｅｖｅ）を含むシームレスカプセル製剤、軟カプセル製剤、および硬カプセル製剤、ならびに比較例１０～１２のカプセル製剤について、実施例４と同様にして、抗体惹起の確認を行った。

また、対照として、腸チフスのフラジェリン分泌発現形質転換微生物（組換えＢ．ｂｒｅｖｅ）生菌、宿主のＢ．ｂｒｅｖｅ生菌、およびリン酸緩衝液をそれぞれ投与した。結果を表４に示す。

【表４】

表４

投与サンプル	BALB/c数	1日投与量 10^7 cfu/日	便中IgA量 (OD±標準誤差)	血清中IgA量 (OD±標準誤差)
実施例7:シームレスカプセル	7	3.5	0.18 ± 0.015	0.44 ± 0.155
実施例7:軟カプセル	7	4.1	0.16 ± 0.013	0.42 ± 0.148
実施例7:硬カプセル	7	3.6	0.20 ± 0.014	0.38 ± 0.140
比較例10:シームレスカプセル	5	3.5	0.05 ± 0.012	0.12 ± 0.033
比較例11:軟カプセル	5	4.1	0.04 ± 0.011	0.11 ± 0.046
比較例12:硬カプセル	5	3.6	0.06 ± 0.013	0.14 ± 0.034
形質転換微生物生菌	5	3.4	0.05 ± 0.011	0.13 ± 0.036
宿主微生物生菌	5	10.5	0.03 ± 0.009	0.12 ± 0.039
リン酸緩衝液	5	ー	0.02 ± 0.007	0.13 ± 0.040

実施例７で得られた腸チフスのフラジェリン分泌発現形質転換微生物を含有する耐酸性のシームレスカプセル、軟カプセル、および硬カプセルの各製剤を摂取させた場合、いずれの形態の耐酸性カプセル製剤を用いても、耐酸性ではない比較例１０～１２のカプセル製剤、生菌のみを摂取させた例に比べて、便中、血中ともにＩｇＡ量が多く、抗体を惹起させる効果が高いことが分かった。

【産業上の利用可能性】

【０００７】

フラジェリンを発現する形質転換微生物を耐酸性カプセル内に入れた製剤とすることにより、抗フラジェリン抗体産生量が向上する。このように腸チフス、コレラ、赤痢などの細菌性感染症に対する経口ワクチンとして効果があることから、細菌性感染症の予防および治療方法が提供できる。近年の薬剤耐性感染症菌の蔓延を考慮すれば、流行地域住民やその地域へ仕事や旅行で出かける人への経口ワクチン投与は、理想的な予防および治療戦略となる。

［配列表］

SEQUENCE LISTING

<110> Morishita Jintan Co., Ltd.
Kobe University

<120> Oral Vaccine

<130> P2-08M03023

<150> JP 2007-70626
<151> 2007-03-19

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Salmonella typhimurium forward primer

<400> 1
catgccatgg atggcacagt cattaataca 30

<210> 2
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Salmonella typhimurium reverse primer

<400> 2
cgcggatcct taacgcagta aagagaggac 30

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Vibrio cholerae forward primer

<400> 3
catgccatgg atggcaatta atgtaaacac g 31

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Vibrio cholerae reverse primer

<400> 4
cgcggatcct ttatcccaat aagctcagag c 31

<210> 5
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Shigella dysenteriae forward primer

<400> 5
catgccatgg atggcacaag tcattaatac 30

<210> 6
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Shigella dysenteriae reverse primer

<400> 6
cgcggatcct ttaaccctgc tgcagagaca 30

<210> 7
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> hup forward primer

<400> 7
cgccaagctt tgggcgcggc ggccatgaag 30

<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> hup reverse primer

<400> 8
cgcgccatgg aaagcatcct tcttgggtca 30

<210> 9
<211> 600
<212> DNA
<213> Bifidobacterium longum

<220>
<221> promoter
<222> (1)..(192)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (193)..(474)
<223>

<220>
<221> terminator
<222> (475)..(600)
<223>

<400> 9
tgggcgcggc ggccatgaag tggcttgaca agcataatct tgtctgattc gtctattttc 60

atacccctt cggggaaata gatgtgaaaa cccttataaa acgcgggttt tcgcagaaac 120

atgcgctagt atcattgatg acaacatgga ctaagcaaaa gtgcttgtcc cctgacccaa 180

gaaggatgct tt atg gca tac aac aag tct gac ctc gtt tcg aag atc gcc 231
Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala
1 5 10

cag aag tcc aac ctg acc aag gct cag gcc gag gct gct gtt aac gcc 279
Gln Lys Ser Asn Leu Thr Lys Ala Gln Ala Glu Ala Ala Val Asn Ala
15 20 25

ttc cag gat gtg ttc gtc gag gct atg aag tcc ggc gaa ggc ctg aag 327
Phe Gln Asp Val Phe Val Glu Ala Met Lys Ser Gly Glu Gly Leu Lys
30 35 40 45

ctc acc ggc ctg ttc tcc gct gag cgc gtc aag cgc ccg gct cgc acc 375
Leu Thr Gly Leu Phe Ser Ala Glu Arg Val Lys Arg Pro Ala Arg Thr
50 55 60

ggc cgc aac ccg cgc act ggc gag cag att gac att ccg gct tcc tac 423
Gly Arg Asn Pro Arg Thr Gly Glu Gln Ile Asp Ile Pro Ala Ser Tyr
65 70 75

ggc gtt cgt atc tcc gct ggc tcc ctg ctg aag aag gcc gtc acc gag 471
Gly Val Arg Ile Ser Ala Gly Ser Leu Leu Lys Lys Ala Val Thr Glu
80 85 90

tga ccttctgctc gtagcgatta cttcgagcat tactgacgac aaagaccccg 524

accgagatgg tcggggtctt tttgttgtgg tgctgtgacg tgttgtccaa ccgtattatt 584

ccggactagt tcagcg 600

<210> 10
<211> 93
<212> PRT
<213> Bifidobacterium longum

<400> 10

Met Ala Tyr Asn Lys Ser Asp Leu Val Ser Lys Ile Ala Gln Lys Ser
1 5 10 15

Asn Leu Thr Lys Ala Gln Ala Glu Ala Ala Val Asn Ala Phe Gln Asp
20 25 30

Val Phe Val Glu Ala Met Lys Ser Gly Glu Gly Leu Lys Leu Thr Gly
35 40 45

Leu Phe Ser Ala Glu Arg Val Lys Arg Pro Ala Arg Thr Gly Arg Asn
50 55 60

Pro Arg Thr Gly Glu Gln Ile Asp Ile Pro Ala Ser Tyr Gly Val Arg
65 70 75 80

Ile Ser Ala Gly Ser Leu Leu Lys Lys Ala Val Thr Glu
85 90

<210> 11
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Bifidobacterium bifidum forward primer

<400> 11
cggcaagctt tatgggggat acaggattgg cgat 34

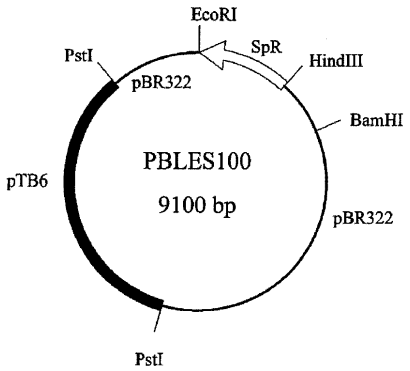
<210> 12
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> Bifidobacterium bifidum reverse primer

<400> 12
gcgcccatgg aaatcgggtg gcgtcctcga ccg 33

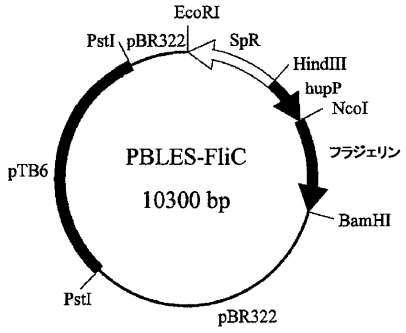
【図１】

第１図



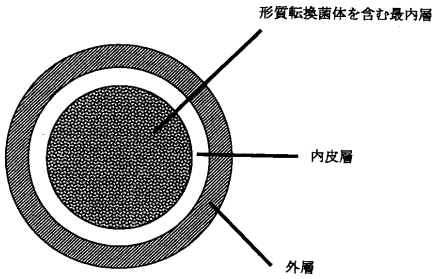
【図２】

第２図



【図３】

第３図



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
Ａ６１Ｐ 31/04 (2006.01) Ａ６１Ｐ 31/04

(72)発明者 高田 哲男
日本国兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内
(72)発明者 谷口 道子
日本国兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内
(72)発明者 岡本 明子
日本国兵庫県神戸市灘区六甲台町１－１ 国立大学法人神戸大学内
(72)発明者 浅田 雅宣
日本国大阪府大阪市中央区玉造１丁目２番４０号 森下仁丹株式会社内
(72)発明者 中辻 雅章
日本国大阪府大阪市中央区玉造１丁目２番４０号 森下仁丹株式会社内

審査官 小堀 麻子

(56)参考文献 特開平０７－０６９８６７（ＪＰ，Ａ）
特開昭６１－１５１１２７（ＪＰ，Ａ）
J Gene Med, ２００６年, Vol.8, No.11, p.1341-6
LANCET, １９９１年, Vol.338, No.8774, p.1055-9
Vaccine, １９９９年, Vol.17, Suppl 2, p.S22-7

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
A61K 39/00-39/395
A61K 9/00- 9/72
A61K 47/00-47/48
CA/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)